

Aus dem Landes-Veterinäruntersuchungsamt  
für Rheinland-Pfalz zu Koblenz  
Leiter: Professor Dr. E. Nitschke

---

Untersuchungen über die Eignung einer  
Kälberhoden-Zelllinie für den Nachweis von  
Virusinfektionen insbesondere des Rindes

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von  
Eric-Uchenna Eze  
Tierarzt aus Ngwo (Nigeria)

Gießen 1973



Aus dem Institut für Virologie und Bakteriologie  
des Reichsanstalts für Hygiene  
Leiter: Professor Dr. E. Hirsch

Untersuchungen über die Eignung einer  
Kälberblut-Zellkulture für den Nachweis von  
Virusinfektionen insbesondere des Rindes

Digitized by the Internet Archive  
in 2026

INAGGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Kaiserlichen Universität  
der Medizinischen Fakultät zu Gießen

Begutachtet von

Eric Urbaneus Dr.

Theodor von Nigam (Gießen)



Aus dem Landes-Veterinäruntersuchungsamt  
für Rheinland-Pfalz zu Koblenz  
Leiter: Professor Dr. E. Nitzsche

---

Untersuchungen über die Eignung einer  
Kälberhoden-Zelllinie für den Nachweis von  
Virusinfektionen insbesondere des Rindes

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von  
Eric-Uchenna Eze  
Tierarzt aus Ngwo (Nigeria)

Gießen 1973

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin in Gießen

---



Dekan: Professor Dr. M. Frimmer

Berichterstatter: Professor Dr. E. Nitzschke

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 12. 1973

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                 | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung                                                                                   | 1     |
| II. Schrifttum                                                                                  | 3     |
| III. Eigene Untersuchungen                                                                      | 7     |
| A. Material und Methoden                                                                        | 7     |
| 1. Nährmedien                                                                                   | 7     |
| 2. Zellkulturen                                                                                 | 8     |
| 3. Virusstämme                                                                                  | 12    |
| 4. Organ- und Kotproben                                                                         | 13    |
| 5. Beimpfung, Bebrütung und<br>Beurteilung der Zellkulturen                                     | 13    |
| 6. Neutralisationsversuche                                                                      | 15    |
| 7. Chloroform-Test                                                                              | 16    |
| B. Versuche und Ergebnisse                                                                      | 17    |
| 1. Untersuchungen über die<br>Empfänglichkeit der Zell-<br>kulturen für bekannte<br>Virusstämme | 17    |
| 2. Neutralisationsversuche                                                                      | 26    |
| 3. Kulturversuche zum Virus-<br>nachweis in Organ- und<br>Kotproben                             | 29    |
| IV. Besprechung der Ergebnisse                                                                  | 32    |
| V. Zusammenfassung                                                                              | 37    |
| VI. Literatur-Verzeichnis                                                                       | 39    |
| Lebenslauf                                                                                      |       |



## I. Einleitung

Seit der Einführung der Einschichtzellrasen-Technik durch die Arbeiten von DULBECCO (1952) und YOUNGNER (1954) sind Zellkulturen in sehr großem Umfange für wissenschaftliche Arbeiten in der Virusforschung herangezogen worden. Zunehmend haben sie aber auch in die virologische Routinediagnostik Eingang gefunden. Sie werden zur Virusisolierung sowie zum Antikörpernachweis verwendet und ermöglichen die Herstellung hochwertiger Antigene für serologische Reaktionen.

Für den Nachweis von Virusinfektionen des Rindes haben sich neben Zellkulturen aus Nieren von Kälbern und Feten in der Laboratoriumsarbeit namentlich auch Kälberhoden-Zellkulturen bewährt. Als Primär- und Sekundärkulturen stellen sie ein empfindliches Substrat für die Erkennung und Vermehrung der Mehrzahl der beim Rind vorkommenden Virusarten dar.

Die Gewinnung von primären und sekundären Kälberhodenzellen bereitete seit ihrer Einführung in die Virusdiagnostik im allgemeinen keine Schwierigkeiten, weil das Ausgangsmaterial von frisch geschlachteten Kälbern in den kommunalen und gewerblichen Schlachthäusern recht regelmässig und in ausreichender Menge zur Verfügung stand. In den letzten Jahren ist infolge des verminderten Auftriebes von Kälbern zur Schlachtung und der Änderung in der Vermarktung überhaupt vielerorts die Beschaffung von frischen Kälberhoden jedoch schwierig geworden. Auf der Suche nach geeignetem Ersatz lag es nahe, u.a. die Verwendung permanenter Zellkulturen in Betracht zu ziehen, die sich im Laboratorium unbegrenzt fortzüchten lassen und von denen Subkulturen jederzeit und in beliebiger Menge

gewonnen werden können. Eine solche Dauerkultur boviner Herkunft war dem Landes-Veterinäruntersuchungsamt Koblenz für Versuchszwecke in dankenswerter Weise von einem Industrielaboratorium überlassen worden.

Zweck der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung der angeführten Kälberhoden-Zelllinie für den Nachweis von Rinder-Virusinfektionen zu untersuchen. Die Prüfung erstreckte sich zunächst auf die Empfindlichkeit der Zellkulturen für bekannte Stämme verschiedener in den einheimischen Rinderbeständen verbreiteter Virusarten. Da in der Routinediagnostik eine möglichst vielseitige Verwendung der vorhandenen Zellkultursysteme erwünscht ist, wurden ergänzend auch Stämme zweier Virusarten getestet, die überwiegend oder ausschliesslich Tiere nichtboviner Species befallen. Sofern sich die Zelllinie für die geprüften Virusarten ausreichend empfindlich zeigte, wurden Versuche zum Antikörpernachweis im Neutralisationstest angestellt. Durchgeführt wurden schliesslich auch Kulturversuche zur Virusisolierung aus Organ- und Kotproben, die hauptsächlich von Rindern und in geringem Umfange von Schweinen und Mähnern stammten.

Bei allen Untersuchungen wurden zum Vergleich primäre und teilweise auch sekundäre Kälberhoden-Zellkulturen sowie ferner Kulturen einer Zelllinie mitgeführt, die im Rahmen eigener Vorversuche durch 29 Subpassagen aus einer primären bovinen fetalen Hautzellkultur entwickelt worden war.

## II. Schrifttum

Nach einem vom Komitee für Nomenklatur der Gewebekultur-Terminologie erarbeiteten und von der 'Tissue Culture Association' im Jahre 1966 in San Franzisko (USA) angenommenen Vorschlag wird als primäre Zellkultur eine in vitro-Kultur definiert, die mit dem Organismus direkt entstammenden Zellen, Geweben oder Organen angelegt wurde. Mit der ersten Subkultivierung, d.h. der Sekundärkultur, entsteht die Zelllinie. Die Potenz zur Fortzüchtung beschränkt sich meist allerdings auf 2 bis 10 Passagen (STARKE, 1968; MAUERSEBERGER, 1971; STARKE u. HLINAK, 1972 u.a.).

Erweist sich eine Kultur als unbegrenzt wachstums- und vermehrungsfähig, so kann sie als etablierte Zelllinie angesprochen werden. Von welchem Zeitpunkt ab im Einzelfall eine solche permanente Zellkultur vorliegt, ist aber nicht leicht zu bestimmen. Eindeutig trifft dies zu, wenn die regelmässige Weiterzüchtung über ein Jahr lang gelungen ist (MAUERSEBERGER, 1971).

Dauerkulturen entstehen im allgemeinen nicht durch Selektion eines bestimmten Zelltyps der primären Kultur, sondern gehen auf sog. transformierte Zellen zurück, die im Laufe der Subkultivierung auftreten (STARKE, 1968). Von den Primärkulturen unterscheiden sich etablierte Zelllinien deshalb fast immer in wesentlichen Merkmalen.

Abgesehen von der bereits erwähnten unbegrenzten Teilungsfähigkeit der Zellen, welche auch die Abgrenzung von den diploiden Zelllinien mit einer beschränkten Lebensdauer von etwa 30 bis 60 Passagen bei unveränderter Chromosomenkonfiguration begründet, sind hier u.a. Veränderungen in der Zellmorphologie und im Karyo-

typ, die Einbusse spezifischer in vivo-Funktionen sowie der Verlust der Kontakthemmung zu nennen, der ein Poly-layer-Wachstum unter Ausbildung des sog. 'Criss-cross'-Phänomens (MEDINA u. SACHS, 1963) gestattet.

Häufig sind die Zellen permanenter Kulturen zur Tumorbildung in vivo befähigt.

Für die verschiedenen Virusarten zeigen Zelllinien oft eine vom Verhalten der originären primären Kulturen abweichende Empfänglichkeit, wobei die Tendenz zur Abnahme oder zum Verlust der Empfindlichkeit deutlich überwiegt (BANG u. GEY, 1952; SHEFFIELD u. CHURCHER, 1957; STARKE, 1968; LEBEDEV u. Mitarb., 1972).

Für die Erforschung der Viren und ihrer pathogenen Eigenschaften wie auch für die virologische Routinearbeit bietet die Verwendung von Zelllinien im Vergleich zu Primärkulturen aus frischen Organen bei gegebener Empfänglichkeit für die in Frage stehenden Virusarten erhebliche Vorteile (SYVERTON u. SCHERER, 1954; GEY u. Mitarb., 1954; STARKE, 1968 u.a.). Letztere liegen vor allem in der ständigen Verfügbarkeit der Zelllinien, welche die Untersucher von der oft umständlichen und kostspieligen Beschaffung des Ausgangsmaterials für primäre Zellkulturen unabhängig macht. Ins Gewicht fällt ebenso der vergleichsweise geringe Arbeits- und Zeitaufwand für die Präparation der Kulturen aus Zelllinien, zumal in der Regel eine hohe Vermehrungsrate gegeben ist. Ferner lässt sich in Dauerkulturen mit weitgehender Sicherheit eine Anwesenheit von Fremd-viren ausschliessen, deren Vorkommen in Primärkulturen auf Grund inapparenter Infektionen der Organspender immer zu befürchten ist; auch Protozoen, L-Formen von Bakterien, Mykoplasmen u.a. können vom Ausgangsmaterial

her eingeschleppt werden (SCHWÖBEL u. SIEDENTOPF, 1961; COOPER, 1961; RUSSEFF, 1970; ULBRICH, 1971; BONIN u. HÖVEL, 1973). Vorteile bieten die Zelllinien schliesslich auch wegen der Uniformität des Zelltyps und des stabilisierten Wachstumsverhaltens.

Den angeführten Vorzügen der Zelllinien steht das nicht unbeträchtliche Risiko einer späteren Kontamination im Laboratorium und der Fortführung der Verunreinigung mit den Zellpassagen gegenüber. Ungewollt eingeführt werden können Viren, Zellen anderer Dauerkulturen und vor allem Mykoplasmen, die in 60 % der permanenten Zellkulturen nachweisbar sein sollen (COOPER, 1961; HAYFLICK, 1965; YERSHOV u. ZEDANOV, 1965; OGOTA u. KOSHIMIZU, 1967; HALLAUER u. Mitarb., 1971; MAUERSBERGER, 1971).

Zelllinien sind aus Organen und Geweben des Menschen und vieler Tierarten entwickelt worden. Auch über Dauerkulturen boviner Herkunft liegt eine Reihe von Berichten vor.

MADIN u. DARBY (1958) züchteten eine Zelllinie (MDBK) aus den Nieren eines adulten Rindes; sie konnten darauf die Viren der infektiösen bovinen Rhinotracheitis und der vesikulären Stomatitis vermehren.

DWIGHT (1964) isolierte aus der Lunge eines einjährigen Büffels eine Zelllinie (BU), die für eine Reihe von Viren empfänglich war; dazu gehörten das Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis, bovine Enteroviren, Parainfluenza 3-Virus, das bovine Virusdiarrhoe-, das Pseudorabies- und das vesikuläre Stomatitis-Virus. Zwei Zelllinien aus bovinen Lymphknoten (BLN 1 und 2) wurden von KALK u. HETRICK (1965) entwickelt; nach ihren Angaben hatten diese Zelllinien ein Virusspektrum ähnlich demjenigen von primären Zellkulturen aus bovinem Gewebe.

Sie konnten darauf u.a. bovine Entero(ECBO)-Viren, das Virus der vesikulären Stomatitis (Indiana Typ), das Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis, Parainfluenza 3-Virus, Newcastle Disease-Virus und das bovine Virusdiarrhoe-Virus züchten. Eine Zelllinie aus embryonaler boviner Trachea (EBTr) gewannen KNIAZEFF u. Mitarb. (1964). Diese Zelllinie war für eine ganze Reihe von Rinderviren empfänglich; sie gestattete die Vermehrung der Viren der infektiösen bovinen Rhinotracheitis, der bovinen Virusdiarrhoe, der Parainfluenza 3 und der vesikulären Stomatitis.

LUDWIG u. Mitarb. (1969) konnten aus Kälbercornea zwei Zelllinien, nämlich KC- und KCe-Zellen isolieren. Die KCe-Zellen wurden aus den KC-Zellen zwischen den 30. und 40. Passagen 'geklont'; sie waren epithelartig. Auf beiden Zelltypen konnten sie verschiedene Virusstämme vermehren, u.a. das Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis, das Aujeszky-Virus, bovine Enteroviren, Parainfluenza 3, Stomatitis vesicularis (Indiana)- und Mucosal Disease-Virus. Die fibroblastenähnlichen KC-Zellen zeigten für die getesteten Virusstämme eine gleich hohe Empfänglichkeit wie die primären oder sekundären Zellkulturen aus Kälberhoden. PIRTLE u. KNIAZEFF (1968) berichteten über die Verwendung hochpassagierter Zelllinien aus embryonaler boviner Milz (EBSP), embryonaler boviner Haut (EBSK) und embryonaler boviner Trachea (EBTr) für die Züchtung von Schweinepestvirus.

### III. Eigene Untersuchungen

#### A. Material und Methoden

##### 1. Nährmedien

Als Wachstumsmedium für die primären und sekundären Kälberhoden-Zellkulturen sowie für die bovine Fetus-haut-Zelllinie diente Earle'sche Lösung mit 10 % inaktiviertem Kälberserum, 0,5 % Laktalbuminhydrolysat, Phenolrot als Indikator (2/100 Volumenteile 0,1 %) und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin); der pH-Wert wurde mittels  $\text{CO}_2$ -Begasung auf 7,0 eingestellt. Dem Erhaltungsmedium waren 2 % inaktiviertes Pferdeserum, 0,2 % Laktalbuminhydrolysat sowie Phenolrot und Antibiotika wie oben zugegeben.

Für die Kälberhoden-Zelllinie fand ein nach POLATNICK und BACHRACH (Appl. Microbiology 12, 368, 1964) modifiziertes Medium mit folgender Zusammensetzung je Liter Verwendung:

|                                                               |           |    |
|---------------------------------------------------------------|-----------|----|
| NaCl                                                          | 7.35      | gm |
| KCl                                                           | 0.4       | "  |
| $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$                      | 0.23      | "  |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$                   | 0.2       | "  |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$         | 0.14      | "  |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$        | 0.63      | "  |
| $\text{NaHCO}_3$                                              | 2.45      | "  |
| $\text{Fe} (\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$       | 0.0001    | "  |
| Glucose                                                       | 4.7       | "  |
| l-Glutamine                                                   | 0.292     | "  |
| l-Histidin-HCl                                                | 0.05      | "  |
| Lactalbuminhydrolysate<br>(Nafton Inc. USA)                   | 5.00      | "  |
| Tryptose<br>(L 47, Nährb. u. Chemie GmbH. Wesel)              | 2.00      | "  |
| Vitamin-Vorratslösung                                         | 18        | ml |
| $\text{H}_2\text{O}$ , demin.<br>(Penicillin u. Streptomycin) | 982       | "  |
| pH-Wert:                                                      | 7,4 - 7,5 |    |

Herstellung der Vitamin-Vorratslösung (s.oben):  
(100-fach konzentriert)

Teillösung I:

|             |       |
|-------------|-------|
| Thiamin     | 2 g   |
| Pantothenat | 2 g   |
| Pyridoxal   | 2 g   |
| Nicotinamid | 2 g   |
| Cholin      | 2 g   |
| Inositol    | 4 g   |
| Riboflavin  | 0,2 g |
| Biotin      | 2 g   |

in 18 Liter demineralisiertem Wasser lösen

Teillösung II:

Folsäure 2 g

in 2 l demin. H<sub>2</sub>O lösen

dazu 20 ml einer n-Na OH

Wenn völlig gelöst, beide Teillösungen mischen.

Dem Wachstumsmedium wurden 10 % Kälberserum, dem Erhaltungsmedium 2 % Pferdeserum und Phenolrot wie oben zugegeben.

## 2. Zellkulturen

### a. Primäre Kälberhoden-Zellkulturen

Die primären Kälberhoden-Zellkulturen (prim.kH-Zellkulturen) wurden in Anlehnung an die Methode von DULBECCO (1952), modifiziert nach YOUNGNER (1954) bzw. GRAFE (1967) hergestellt.

Das aus der Tunica vaginalis steril herausgeschälte und mit einer Schere zerkleinerte Hodenparenchym wurde für 10 Minuten in 0,25 %iger Trypsinlösung in Phosphatpuffer (PBS nach DULBECCO und VOGT, 1954) mittels

Magnetrührer vortrypsiniert. Nach Abgießen des Überstandes folgte die Trypsinierung der Gewebestückchen zweimal für die Dauer von je 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C.

Die gewonnene Suspension wurde durch Mullfiltration (Zweischicht) von grobem Material befreit und dann für die Dauer von 10 Minuten bei etwa 1200 U/min (Christ Typ UJ 3 S) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Wachstumsmedium gewaschen, durch Mullfilter (10fache Schicht) gegeben und erneut wie oben ausgeschleudert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in Anzuchtmedium so aufgenommen, daß sich ein Zellgehalt von 750 000 / ml ergab.

Die Zellsuspension wurde in Röhrchen (je 1,8 ml), Roux-Schalen (je 50 ml), Vierkantflaschen (je 18 ml) oder Schälchen mit einem Durchmesser von 5 cm (je 5 ml) abgefüllt. Die Bebrütung erfolgte stationär bei 37°C; Schälchen wurden dabei in CO<sub>2</sub>-Luftgemisch gehalten. Die genannten Abfüllmengen galten auch für Zellkulturen anderer Art.

#### b. Sekundäre Kälberhoden-Zellkulturen

(Sek. KH-Zellkulturen)

Nachdem die primäre Kultur in der Rouxschale innerhalb von 3 - 4 Tagen einen geschlossenen Zellrasen ausgebildet hatte, wurde dieser mit 0,25 %iger Trypsinlösung gewaschen. Der nach Abgießen der Trypsinlösung bleibende feine Trypsinfilm brachte den Zellrasen im Brutschrank innerhalb von 10 Minuten bei 37°C zur Ablösung von der Glaswand. Die gewonnenen Zellen wurden in Wachstumsmedium so aufgenommen, daß ihre Zahl  $3 \times 10^5$  in 1 ml betrug. Diese Zellsuspension wurde in Röhrchen abgefüllt und stationär bei 37°C bebrütet. Ein geschlossener Zellrasen bildete sich binnen 3 - 4 Tagen aus.

c. Kälberhoden-Zelllinie  
(KH-Zelllinie)

Die Zelllinie wurde uns in der 38. Passage überlassen und in Rouxschalen bis zur 120. Passage weitergeführt; Röhrchenkulturen aus diesen Passagen dienten zur Durchführung der Versuche.

Zur Fortzüchtung bzw. Aussaat wurde der Zellrasen mit einer 0,25 %igen Trypsinlösung in PBS gewaschen, wobei nach dem Abgießen ein sehr dünner Trypsinfilm auf der Oberfläche blieb. Eine Bebrütung für die Dauer von 5 Minuten bei 37°C reichte zur Ablösung des Zellrasens vom Glas aus. Nach gründlicher Durchmischung unter Zugabe von Wachstumsmedium wurden die Zellen auf eine Dichte von 250 000 / ml eingestellt, abgefüllt und bebrütet wie oben. Drei Tage später war der Zellrasen geschlossen.

Zur Erhaltung der KH-Zelllinie wurde in drei- bis viertägigem Rhythmus umgesetzt. Das Zellbild wurde von Fibroblasten bestimmt, epitheloide Zellen waren nur in geringem Maße zu beobachten.

Einen Tag nach dem Umsetzen zeigten die Zellen langgestreckte protoplasmatische Fortsätze, womit sie mit Nachbarzellen in Kontakt traten; die Zelleiber erschienen länglich mit rundem oder ovalem Kern. Am zweiten Tage nach dem Umsetzen zeigte sich bereits ein deutliches 'Criss-cross'-Phänomen (ABDINA u. SACS, 1963); über die am Glas haftenden Zellen wuchsen weitere Schichten. Vom dritten Tage ab war der Zellrasen völlig geschlossen; das Polylayerwachstum bot das Bild dichtgestaffelter Zellschichten. In das Kulturmedium wurden rundliche Zellen abgegeben.

Umbeimpfte Zellrasen begannen vom neunten Tage an spontan zu degenerieren. Es bildeten sich Lücken in

den Rasen, wobei die dem Glas anhaftende Schicht zunächst meist erhalten blieb.

Um die Möglichkeit der Konservierung der Kälberhoden-Zelllinie zu prüfen, wurden durch Trypsinierung gewonnene Zellen nach den Angaben von LUDWIG u. Mitarb. (1969) eingefroren. An Stelle von Glyzerin fand Dimethylsulfoxid (DMSO) 10 % Verwendung. Es zeigte sich, daß die bei  $-70^{\circ}\text{C}$  mehrere Monate lang gelagerten Zellen nach schnellem Auftauen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  wieder gut zur Vermehrung gebracht werden konnten.

#### d. Bovine Fetushaut-Zelllinie

(FtH-Zelllinie)

Sie wurde aus einer primären bovinen fetalen Haut-Zellkultur entwickelt. Einem etwa 3 Monate alten Fetus waren Teile des Unterhautgewebes steril entnommen und mit einer Schere fein zerkleinert worden. Nach zweimaliger Trypsinierung für je 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad wurden die Zellen gewaschen, in Wachstumsmedium mit einer Dichte von 750 000 Zellen/ml aufgenommen und in einer Rouxschale stationär bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Binnen 3 Tagen bildete sich ein geschlossener Zellrasen aus.

Die Fortführung erfolgte analog wie bei der Kälberhoden-Zelllinie; die Dichte bei der Aussaat betrug  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml Wachstumsmedium. Die Vermehrungsrate belief sich auf 1:4 bis 1:5 bei drei- bis viertägigem Umsatzrhythmus.

In den ersten Passagen zeigten die Kulturen Monolayer-Wachstum mit vorherrschendem epithelartigen Zellbild. Etwa von der fünften Passage an traten fibroblasten-ähnliche Zellen immer mehr in den Vordergrund. Später wurde dann das 'Criss-cross'-Phänomen erkennbar, so daß schließlich Poly-layerwachstum bestand. Für die durchzuführenden Versuche fanden Röhrchenkulturen der 30. bis 68. Passage Verwendung.

### 3. Virusstämme

Für die Prüfung der Empfänglichkeit der verschiedenen Zellkulturen standen die folgenden Virusstämme zur Verfügung:

- a) IBR/IPV-Virus (infekt.bovine Rhinotracheitis/infekt. pustulöse Vulvovaginitis)
  - Stamm Astor (2.und 3.Passage in KH-Zellkulturen)
  - " IPV 5 (6.und 7.Passage in KH-Zellkulturen)xxx)
  - " IPV WII (4.und 5.Passage in KH-Zellkulturen)xxx)
- b) MD/VD-Virus (Mucosal Disease/Virusdiarrhoe)
  - Stamm MD 1 (15.Passage in KH-Zellkulturen)
  - " Oregon (17.Passage in KH-Zellkulturen) x)
  - " Lamspringe 735 (47.Passage in KH-Zellkulturen)x)
  - " Osloss 2482 ( 6.Passage in KH-Zellkulturen)x)
- c) Bovines Enterovirus
  - Stamm LCR 4 (22.und 23.Passage in KH-Zellkulturen)
- d) Parainfluenza 3-Virus
  - Stamm R (vermehrt in Kälbernieren-Zellkulturen, Zahl der Passagen nicht bekannt)
- e) Bovines Adenovirus
  - Stamm 671130 Typ 6 ( 4.Passage in KH-Zellkulturen)xx)
  - " Fukuroi Typ 7( 4.Passage in KH-Zellkulturen)xx)
  - " Misk 67 Typ 8(31.Passage in KH-Zellkulturen)xx)
- f) Aujeszky-Virus
  - Stamm H II (17.und 18.Passage in Kückenfibroblasten-kulturen)
  - " Phylaxia(gezüchtet in BHK-Zellen, Zahl der Passagen nicht bekannt) xxxx)
- g) Newcastle Disease Virus
  - Stamm Montana (5. Bruteipassage)

---

Für die Überlassung der mit x), xx), xxx) bzw. xxxx) gekennzeichneten Virusstämme sei den Herren Prof.Dr.Liess (Hannover), Prof.Dr.Dr.Mayr (München), Priv.Doiz.Dr.Straub und Dr.Jakubik(Tübingen) auch an dieser Stelle gedankt.

#### 4. Organ- und Kotproben

Für Virusisolierungsversuche fanden Organ- und Gewebeproben Verwendung, die hauptsächlich von Rindern sowie in geringem Umfange auch von Schweinen stammten und dem Landes-Veterinäruntersuchungsamt in Koblenz zum Zwecke diagnostischer Untersuchungen eingesandt worden waren; es handelte sich dabei um Schleimhaut der oberen Luftwege oder des Magendarmtraktes, Tonsillen, Lymphknoten, Milz-, Leber- oder Nierenteile. Darüber hinaus wurden im Schlachthof Koblenz entnommene Kotproben von Rindern und Schweinen untersucht.

Sämtliche Proben wurden unter Zugabe von ungefähr neun Teilen PBS (Volumen) je Gewichtsteil Untersuchungsmaterial homogenisiert (Ultra-Turrax, Janke und Kunkel) und anschließend 10 min. bei 3000 U/min. (Christ, Typ UJ 3 S) zentrifugiert. Die Überstände dienten nach Zusatz von Penicillin (500 IE/ml) und Streptomycin (0,5 mg/ml) und zweistündiger Aufbewahrung bei 4° bis 6°C als Impfmateriail.

#### 5. Beimpfung, Bebrütung und Beurteilung der Zellkulturen

##### a. Versuche mit bekannten Virusstämmen

Die Viruskulturflüssigkeiten wurden mit PBS in Zehnerpotenzen verdünnt. Mit diesen Verdünnungen wurden jeweils 3 - 4 Röhrchen der verschiedenen Zellkulturen beimpft, indem je 0,2 ml Inokulum dem in den Kulturröhrchen befindlichen Erhaltungsmedium (1,8 ml) zugefügt wurde. Die weitere Bebrütung erfolgte bei 37°C. Abgelesen wurde täglich während eines Zeitraumes bis zu fünf Tagen.

Die Beurteilung der Empfänglichkeit der Zellkulturen stützte sich auf die mikroskopische Feststellung des zytopathischen Effektes (CPE); der Virustiter

wurde nach REED und MUENCH (1938) berechnet. Sofern in beimpften Kulturen ein CPE ausblieb, wurden diese am Ende der Beobachtungszeit dem Brutschrank entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt; die geernteten Kulturen wurden regelmässig in einer zweiten und erforderlichenfalls dritten Passage geprüft. Von den Zelllinien-Kulturen fand in den meisten Fällen eine Rückimpfung auf die ursprünglich zur Vermehrung des Testvirus verwendete Zellart statt.

Plaquetests wurden in Anlehnung an die von BABIKER und ROTT (1968) beschriebene Methode ausgeführt. Sobald sich in den Schälchen konfluierende Zellrasen gebildet hatten, wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Mit den in Zehnerpotenzen verdünnten Viruskulturflüssigkeiten wurden jeweils mindestens zwei Schälchenkulturen der verschiedenen Zellarten beimpft; die Impfdosis pro Schälchen betrug 0,2 ml. Nach zweistündiger Adsorption im  $\text{CO}_2$ -Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellrasen erneut zweimal mit PBS gewaschen und je Schälchen mit 5 ml eines auf die Temperatur von  $+42^{\circ}\text{C}$  gebrachten Mediums der folgenden Zusammensetzung überschichtet:

Earle'sche Lösung doppelt (d.h. alle Inhaltsstoffe mit Ausnahme des Bikarbonats in doppelter Konzentration)

mit 1 % Laktalbuminhydrolysat  
0,1 % Glutamin  
0,2 % Hefeextrakt (Difco)  
20 % inaktiviertem Pferdeserum  
Penicillin und Streptomycin

zu gleichen Volumenteilen gemischt mit einer 1,5 % Agarlösung (Difco).

Die überschichteten Kulturen wurden nach viertägiger Bebrütung im CO<sub>2</sub>-Schränk bei 37°C mit einer Neutralrot-Lösung (0,005 %) gefärbt; sie verblieben weitere drei Stunden im Brutschränk; anschließend konnten vorhandene Plaques gezählt werden.

#### b. Versuche mit Organ- und Kotproben

Die Suspensionen wurden unverdünnt und mit PBS 1:10 verdünnt geprüft. Mit je 0,2 ml dieser Aufarbeitungen wurden jeweils 3 - 4 Kulturröhrchen beimpft, nachdem zuvor das Nährmedium abgegossen und der Zellrasen mit PBS gewaschen worden war.

Nach zweistündiger Adsorptionszeit bei 37°C und annähernd waagerechter Lagerung der Röhrchen wurden die Inokula entfernt, die Kulturen nochmals mit PBS gewaschen und mit 1,8 ml Erhaltungsmedium je Röhrchen versehen. Die weitere Bebrütung und die Beobachtung der Kulturen erstreckten sich bei Ausbleiben zytopathischer Veränderungen in der Regel auf 5 Tage; eine zweimalige Überimpfung auf neue Kulturen schloss sich an.

#### 6. Neutralisationsversuche

Sie dienten der Identifizierung von Virusisolaten oder der Prüfung der KH-Zelllinie auf ihre Eignung für den serologischen Antikörperrnachweis.

Im ersten Falle wurden abgestufte Verdünnungen der zu prüfenden Virusflüssigkeit mit konstanten Mengen von spezifischem Immunserum oder von Normalserum gemischt, während im zweiten Falle steigende Verdünnungen von Testseren auf eine im Vorversuch ermittelte, konstante Virusdosis einwirkten.

Die Bebrütung der Gemische erfolgte eine Stunde lang im Wasserbad bei 37°C.

Von den abgestuften Gemischen wurde je 0,2 ml auf jeweils mindestens zwei Röhrchenkulturen (mit 1,8 ml Erhaltungsmedium) übertragen. Die Kulturen wurden bei 37°C weiterbebrütet und während einer Zeitspanne von vier Tagen täglich beurteilt. Eine Virusneutralisation war am Ausbleiben des CPE erkennbar.

#### 7. Chloroform-Test

Der zu prüfenden Viruskulturflüssigkeit wurde das zweimal mit PBS gewaschene Chloroform in gleicher Menge zugegeben und die Mischung in einem geschlossenen Röhrchen 10 min. bei Zimmertemperatur kräftig geschüttelt (BÖGEL u. MAYR, 1962). Die Viruskultur ohne Chloroformzusatz diente bei gleicher Behandlung als Kontrolle. Beide Röhrchen wurden anschließend 5 min. bei 1200 U/min. zentrifugiert; der über dem Chloroform befindliche Überstand wurde im Vergleich mit dem Kontrollmaterial mit Hilfe der Gewebekultur auf Infektiosität geprüft.

## B. Versuche und Ergebnisse

### 1. Untersuchungen über die Empfänglichkeit der Zellkulturen für bekannte Virusstämme

#### a. IBR/IPV-Virus

(infekt.bovine Rhinotracheitis/infekt. pustulöse Vulvovaginitis)

In den primären und sekundären Kälberhoden (KH)-Zellkulturen ließen sich die verwendeten IBR/IPV-Virusstämme, wie Tabelle 1 zeigt, mit deutlichem cytopathischen Effekt (CPE) vermehren. Bei hohen Infektionsdosen kam es schon innerhalb von 24 Stunden zur Ausbildung der typischen Zellveränderungen (Abkugelung, bläschenförmige Aufquellung, Granulierung, Schrumpfung, Cytolysis), wie sie u.a. von BINDRICH (1960), SCHIMMELPFENNIG u. LIESS (1961), HAHNENFELD u. Mitarb. (1970) sowie WILKE u. LETZ (1970) beschrieben worden sind; in den mit kleineren Virusmengen inokulierten Kulturen gelangte der Zellrasen gewöhnlich binnen 48 Stunden zur Auflösung.

Tabelle 1: Cytopathischer Effekt und Infektiositätstiter von IBR/IPV-Virusstämmen in den verschiedenen Zellkulturen (Röhrchen)

| Versuch | Virus Stamm | prim. KH-Zellkultur | sek. KH-Zellkultur | KH-Zelllinie | Fth-Zelllinie |
|---------|-------------|---------------------|--------------------|--------------|---------------|
| 1       | Astor       | CPE $10^{-6,0}$     | -                  | ohne CPE     | -             |
| 2       | Astor       | CPE $10^{-6,0}$     | CPE $10^{-4,5}$    | ohne CPE     | -             |
| 3       | Astor       | CPE $10^{-5,7}$     | -                  | ohne CPE     | ohne CPE      |
| 4       | Astor       | CPE $10^{-5,7}$     | -                  | ohne CPE     | ohne CPE      |
| 5       | IPV 5       | CPE $10^{-4,3}$     | -                  | ohne CPE     | ohne CPE      |
| 6       | IPV 5       | CPE $10^{-6,5}$     | -                  | ohne CPE     | ohne CPE      |
| 7       | IPV VII     | CPE $10^{-6,5}$     | -                  | ohne CPE     | ohne CPE      |

In den permanenten Zellkulturen (Kälberhoden (KH)- und Fetushaut (FtH)-Zelllinie) bewirkten die IBR/IPV-Virusstämme hingegen auch bei Durchführung von drei Passagen keinen CPE.

Durch die Rückübertragung von beimpften Kulturen der KH-Zelllinie (1. Passage, geerntet nach 96 Stunden Bebrütung, kurzzeitig aufbewahrt bei  $-18^{\circ}\text{C}$ ) auf primäre KH-Zellen konnte zunächst allerdings noch infektiöses Virus nachgewiesen werden (Beispiel s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Virusnachweis (Stamm Astor) in der KH-Zelllinie durch Rückimpfung auf primäre KH-Zellen

|                                                              | Impfdosis<br>je Röhrchen<br>der 1. Passage<br>(KID <sub>50</sub> ) | 1. Passage<br>Infek-<br>tiosi- CPE<br>tät | 2. Passage<br>Infek-<br>tiosi- CPE<br>tät | 3. Passage<br>Infek-<br>tiosi- CPE<br>tät |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Kulturen<br>KH-<br>Zelllinie                                 | 50000                                                              | ++++ <sup>x)</sup> 0                      | ---- 0                                    | --- 0                                     |
|                                                              | 5000                                                               | ++++ 0                                    | ---- 0                                    | --- 0                                     |
|                                                              | 500                                                                | ++++ 0                                    | ---- 0                                    | --- 0                                     |
|                                                              | 50                                                                 | +--- 0                                    | ---- 0                                    | --- 0                                     |
|                                                              | 5                                                                  | ---- 0                                    | ---- 0                                    | --- 0                                     |
|                                                              | 0,5                                                                | ---- 0                                    | ---- 0                                    | --- 0                                     |
|                                                              | 0,05                                                               | ---- 0                                    | ---- 0                                    | --- 0                                     |
| prim.<br>KH-<br>Zell-<br>kulturen<br>(Vergleichs-<br>ansatz) | 50000                                                              | ++++ CPE                                  | ++++ CPE                                  |                                           |
|                                                              | 5000                                                               | ++++ CPE                                  | ++++ CPE                                  |                                           |
|                                                              | 500                                                                | ++++ CPE                                  | ++++ CPE                                  |                                           |
|                                                              | 50                                                                 | ++++ CPE                                  | ++++ CPE                                  |                                           |
|                                                              | 5                                                                  | ++++ CPE                                  | ++++ CPE                                  |                                           |
|                                                              | 0,5                                                                | +--- CPE                                  | ++++ CPE                                  |                                           |
|                                                              | 0,05                                                               | ---- 0                                    | ---- 0                                    |                                           |

x) Jedes Zeichen steht für ein Zellkulturröhrchen

Damit ergab sich die Frage, ob das IBR/IPV-Virus in der KH-Zelllinie eine Vermehrung ohne Ausbildung eines CPE erfahren hatte oder bei der beschriebenen Rückpassage vom ursprünglichen Inokulum stammende restliche Infektiosität erfasst worden war.

Gegen die erstgenannte Erklärung sprach das Resultat der Rückimpfungen von der 2. und 3. Passage der KH-Zelllinie auf prim. KH-Zellkulturen; zur Erzeugung eines CPE befähigtes Virus war dabei nicht zu ermitteln.

Im gleichen Sinne wurde das Ergebnis eines weiteren Versuches gedeutet, bei dem die mit IBR/IPV-Virus (Stamm Astor) in abgestuften Verdünnungen inokulierten Polylayer der KH-Zelllinie 12 und 36 Stunden nach der Beimpfung jeweils mehrfach mit PBS gewaschen und mit frischem Erhaltungsmedium versehen worden waren. Nach insgesamt 96-stündiger Bebrütung wurden die Kulturen bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren; nach dem Auftauen wurde der Inhalt der Röhrchen getrennt nach den einzelnen Virusverdünnungsstufen gepoolt und die Infektiosität der Gemische in prim. KH-Zellkulturen titriert. Das Gemisch der eingangs mit je  $5 \times 10^4$   $\text{KID}_{50}$  des IBR/IPV-Virus beimpften Röhrchenkulturen (2 ml) wies bei der Titration noch  $10^3$   $\text{KID}_{50}/0,2$  ml und das auf ein Inokulum von  $5 \times 10^3$   $\text{KID}_{50}$  zurückgehende Gemisch nur noch 3  $\text{KID}_{50}/0,2$  ml auf. In den KH-Zelllinie-Kulturen der 2. und 3. Passage konnte durch Rückübertragung auf prim. KH-Zellen Virus nicht mehr nachgewiesen werden.

#### b. Mucosal Disease-Virus

Mit den vier zur Prüfung verwendeten Virusstämmen der Mucosal-Disease/Virusdiarrhoe (MD/VD) konnte ein CPE nur in prim. KH-Zellen erzeugt werden. Die cytopathologische Wirkung äußerte sich in Übereinstimmung mit den

Angaben von GILLESPIE u. Mitarb. (1959), BÜGEL (1964), LIEBERMANN (1966), KOKLES u. Mitarb. (1967), HAFEZ (1967) AVELLINI u. Mitarb. (1968) u.a. vor allem als vakuolisierende Degeneration und Schrumpfung der Zellen; sie trat vom zweiten Tage nach der Beimpfung ab in Erscheinung und ging mit der Bildung von cytopathogenem Virus einher. In Kulturen der KH- oder der Fth-Zelllinie (1. bis 3. Passage) konnte weder ein CPE festgestellt noch bei der Rückimpfung auf prim. KH-Zellkulturen zur Auslösung eines CPE befähigtes Virus nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Cytopathischer Effekt und Infektiositätstiter von MD/VD-Virusstämmen in den verschiedenen Zellkulturen (Röhrchen)

| Versuch | Virus-Stamm       | prim.<br>KH-Zell-<br>kultur | KH-<br>Zelllinie | Fth-<br>Zelllinie |
|---------|-------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|
| 1       | MD 1              | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 2       | MD 1              | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 3       | MD 1              | CPE $10^{-4,7}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 4       | Oregon            | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 5       | Oregon            | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 6       | Oregon            | CPE $10^{-4,3}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 7       | Lamspringe<br>735 | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 8       | Lamspringe<br>735 | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 9       | Lamspringe<br>735 | CPE $10^{-4,7}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 10      | Osloss 2482       | CPE $10^{-4,7}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 11      | Osloss 2482       | CPE $10^{-4,7}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 12      | Osloss 2482       | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |

### c. Bovines Enterovirus

Der bovine Enterovirusstamm LCR 4 ließ sich in Röhrchenkulturen aller vier geprüften Zellarten vermehren. Ein CPE trat bereits am ersten Tage nach der Beimpfung auf und stimmte grundsätzlich mit den von BÖGEL u. MUSSGAY (1960) beschriebenen, in Kälbernieren-Zellkulturen beobachteten Veränderungen (rasche Schrumpfung der Zellen und Auflösung des Rasens) überein. Die anhand des CPE ermittelten Virus-titer lagen in den Kulturen der KH- und der Etk-Zelllinie allerdings deutlich niedriger als in den primären und sekundären Zellkulturen (s. Tabelle 4). Das Virus konnte in allen Zellarten fortgeführt werden.

Tabelle 4: Cytopathischer Effekt und Infektiositätstiter des bovinen Enterovirus LCR 4 in den verschiedenen Zellkulturen (Röhrchen)

| Versuch | prim.<br>KH-Zell-<br>kultur | sek.<br>KH-Zell-<br>kultur | KH-<br>Zelllinie | Etk-<br>Zelllinie |
|---------|-----------------------------|----------------------------|------------------|-------------------|
| 1       | CPE $10^{-5,5}$             | CPE $10^{-6,5}$            | CPE $10^{-4,0}$  | ---               |
| 2       | CPE $10^{-6,5}$             | ---                        | CPE $10^{-4,0}$  | ---               |
| 3       | CPE $10^{-7,0}$             | ---                        | CPE $10^{-5,5}$  | CPE $10^{-5,5}$   |
| 4       | CPE $10^{-5,5}$             | ---                        | CPE $10^{-5,5}$  | CPE $10^{-5,5}$   |

Die geschilderten Ergebnisse wurden mit virusinfizierten Zellkulturen, d.h. mit Virusflüssigkeiten gewonnen, die organische Begleitstoffe in nicht allzu großer Menge enthielten. Im Hinblick auf die Verwendung der KH-Zelllinie z.B. für die Isolierung von Enteroviren aus Organmaterial infizierter Tiere ergab sich die Frage, ob und in welchem Umfange die Empfindlichkeit des Nachweises durch die Ballaststoffe in Gewebe- und Organ-suspensionen beeinflusst werden kann. Durch ein orientierendes Experiment wurde versucht, diesbezügliche Anhaltspunkte zu gewinnen.

Eine Viruskulturflüssigkeit (LCR 4) wurde dabei mit einem 5 %igen Rindermilz-Homogenisat in PBS nach Zehnerpotenzen verdünnt und vergleichend sowohl in der KH-Zelllinie als auch in prim. KH-Zellen unter Anwendung der in Abschnitt III A 5.b. beschriebenen Impftechnik titriert. Während die organischen Ballaststoffe bei den prim. KH-Zellkulturen eine Senkung des Infektiositätstiters ( $KID_{50}$ ) gegenüber der mit PBS allein verdünnten Präparation um nur eine halbe Zehnerpotenz bewirkten, war unter gleichen Voraussetzungen bei der KH-Zelllinie ein Titerabfall um 3,5 Zehnerpotenzen zu verzeichnen.

Untersuchungen mit dem Enterovirusstamm LCR 4 in Schälchenkulturen ergaben, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen Plaques nur in prim. KH-Zellkulturen, nicht aber in Kulturen der Kn-Zelllinie gebildet wurden; die Zahl der plaquebildenden Einheiten in 0,2 ml der Verdünnung  $10^{-6}$  betrug 17, 18 und 18 (3 Schälchen).

#### d. Parainfluenza 3 - Virus

Die Vermehrung des Parainfluenza 3 - Virus Stamm R gelang in prim. KH-Zellkulturen; ein beginnender CPE (Rasendefekte, Zellabrundungen) konnte 48 Stunden nach Beimpfung der Röhrchen beobachtet werden. Am folgenden Tag war etwa die Hälfte der Zellen betroffen und in größerer Zahl hatten sich Synzytien gebildet. Cytopathogenität und Vermehrungsweise entsprechen den Berichten von BERGMANN u. LIEBERMANN (1967), KAMINJOLO (1969) und LUDWIG u. PAULSEN (1969). In Kulturen der KH- oder der Fth-Zelllinie kam es weder zur Ausbildung eines CPE noch zur Virusvermehrung. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Cytopathischer Effekt und Infektiositätstiter des Parainfluenza 3 - Virusstammes R in den verschiedenen Zellkulturen (Röhrchen)

| Versuch | prim.<br>KH-Zellen | KH-<br>Zelllinie | Fth-<br>Zelllinie |
|---------|--------------------|------------------|-------------------|
| 1       | CPE $10^{-4,5}$    | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 2       | CPE $10^{-5,5}$    | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 3       | CPE $10^{-5,5}$    | ohne CPE         | ohne CPE          |

e. Bovines Adenovirus

Die verwendeten Adenovirusstämme (Serotypen 6, 7 und 8) konnten gleichfalls nur in den prim. KH-Zellkulturen zur Vermehrung gebracht werden; der CPE zeigte sich in Übereinstimmung mit den Angaben von BARTHA (1968), GUENOV u. Mitarb. (1969) und ÁLDÁSY (1970) als Granulierung, Abrundung, Zusammenballung sowie Lysis der Zellen und war ab dem zweiten Tage nach der Beimpfung der Kulturen nachweisbar. Die KH- und die Fth-Zelllinie ließen sich zur Züchtung der bovinen Adenovirusstämme nicht verwenden (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Cytopathischer Effekt und Infektiositätstiter von bovinen Adenoviren in verschiedenen Zellkulturen (Röhrchen)

| Versuch | Virus-<br>Stamm | prim.<br>KH-Zell-<br>kultur | KH-<br>Zelllinie | Fth-<br>Zelllinie |
|---------|-----------------|-----------------------------|------------------|-------------------|
| 1       | 671130 (Typ 6)  | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 2       | 671130 (Typ 6)  | CPE $10^{-4,7}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 3       | 671130 (Typ 6)  | CPE $10^{-4,7}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 4       | 671130 (Typ 6)  | CPE $10^{-4,7}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 5       | Fukuroi (Typ 7) | CPE $10^{-4,0}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 6       | Fukuroi (Typ 7) | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 7       | Fukuroi (Typ 7) | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 8       | Fukuroi (Typ 7) | CPE $10^{-4,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 9       | Misk 67         | CPE $10^{-2,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 10      | Misk 67         | CPE $10^{-2,5}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |
| 11      | Misk 67         | CPE $10^{-2,7}$             | ohne CPE         | ohne CPE          |

# f. Aujeszky-Virus

Beide Aujeszky-Virusstämme (H II und Phylaxia) konnten sowohl in prim. KH-Zellkulturen als auch in Kulturen der KH- und der Fth-Zelllinie unter Bildung eines CPE vermehrt und in Passagen fortgeführt werden. In den beiden erstgenannten Kulturarten zeigten sich bei relativ hohen Impfdosen bereits 24 Stunden später die meisten Zellen verändert. Es bildeten sich vorwiegend großblasige Zellen, die in Haufen zusammenlagen. Wurde mit kleineren Virusmengen inokuliert, trat ein CPE ~~im~~ zunächst herdförmig mit Zellabkuglung und Bildung von Synzytien in Erscheinung, bis später der ganze Zellrasen erfaßt wurde. Die Veränderungen ähnelten den von PETTE u. HADNELL (1964), ŠKODA u. MITARD. (1963) u.a. geschilderten Bildern.

Besondere Erwähnung verdient allerdings, daß in den Kulturen der Fth-Zelllinie ein CPE erst in der 3. Passage, d.h. nach zwei offenbar zur Adaptierung erforderlichen sog. Blindpassagen in Erscheinung trat; er trat während der Bebrütung im Vergleich zu den Kulturen der prim. KH-Zellen und der KH-Zelllinie zeitlich auch verzögert auf.

Die Ergebnisse der Versuche sind aus Tabelle 7 ersichtlich.

Tabelle 7: Cytopathischer Effekt und Infektiositätstiter von Aujeszky-Virusstämmen in verschiedenen Zellkulturen (Röhrchen)

| Versuch | Virus Stamm | prim. KH-Zell kultur | KH-Zelllinie    | Fth-Zelllinie   |
|---------|-------------|----------------------|-----------------|-----------------|
| 1       | H II        | CPE $10^{-5,5}$      | CPE $10^{-5,7}$ | ---             |
| 2       | H II        | CPE $10^{-5,5}$      | CPE $10^{-5,5}$ | CPE $10^{-4,5}$ |
| 3       | Phylaxia    | CPE $10^{-5,3}$      | CPE $10^{-4,5}$ | ---             |
| 4       | Phylaxia    | CPE $10^{-5,5}$      | CPE $10^{-4,7}$ | ---             |

Um einen Hinweis bezüglich der Eignung der KH-Zelllinie für die Anzüchtung von Aujeszky-Virus aus Organmaterial infizierter Tiere zu erlangen, wurde ergänzend ein orientierender Versuch in ähnlicher Weise durchgeführt, wie er mit dem bovinen Enterovirus (s.Abschnitt III B 1. c.) angestellt worden war.

Als begleitstoffreiches Verdünnungsmedium diente in diesem Experiment ein 5 %iges Schweinemilz-Homogenisat, als Testvirus der Stamm H II. Durch die organischen Ballaststoffe wurde der Infektiositätstiter in den primären KH-Zellkulturen nicht merklich und in den Kulturröhrchen der KH-Zelllinie nur geringfügig (0,6 Zehnerpotenz) beeinträchtigt.

In Schälchenkulturen konnten bei der gewählten Versuchstechnik mit dem Aujeszky-Virusstamm H II Plaques wohl im Monolayer der prim. KH-Zellen, nicht aber im Poly-layer der KH-Zelllinie erzeugt werden. Die Verdünnung  $10^{-5}$  der Virusflüssigkeit wies in drei Schälchen 25, 23 bzw. 15 plaquebildende Viruseinheiten/0,2 ml auf.

#### g. Newcastle Disease-Virus

Für die Züchtung des Newcastle Disease-Virusstammes Montana eigneten sich bemerkenswerterweise nur die Kulturen der KH- sowie der Fth-Zelllinie, während in prim. KH-Zellkulturen weder ein CPE auftrat noch eine Virusvermehrung nachweisbar war (s.Tabelle 8). Der in beiden permanenten Kulturarten beobachtete CPE zeigte sich zwei Tage nach der Beimpfung in Form von herdförmigen Zellschrumpfung. Einen Tag später waren etwa 75 % der Zellen verändert, wobei die Bildung von Synzytien und eine zunehmende Ablösung vom Glas auftraten.

Tabelle 8: Cytopathischer Effekt und Infektiositätstiter des Newcastle Disease-Virusstammes Montana in den verschiedenen Zellkulturen (Röhrchen)

| Versuch | prim.<br>KH-<br>Zellkultur | KH-<br>Zelllinie | FtH-<br>Zelllinie |
|---------|----------------------------|------------------|-------------------|
| 1       | ohne CPE                   | CPE $10^{-5,7}$  | ---               |
| 2       | ohne CPE                   | CPE $10^{-5,5}$  | ---               |
| 3       | ohne CPE                   | CPE $10^{-6,2}$  | CPE $10^{-5,5}$   |
| 4       | ohne CPE                   | CPE $10^{-5,5}$  | CPE $10^{-5,5}$   |

## 2. Neutralisationsversuche

Die vorangegangenen Untersuchungen haben u.a. gezeigt, daß die KH-Zelllinie für das Enterovirus LCR 4 sowie für das Aujeszkyvirus H II und Phylaxia empfänglich ist und diese Virusstämme sich in Kulturen der genannten Zellart anhand des CPE titrieren lassen; die mit dem Enterovirusstamm erhaltenen Infektiositätstiter lagen allerdings um 1 bis 2,5 Zehnerpotenzen unter den mit prim. KH-Zellkulturen festgestellten Titerwerten.

Es erschien nun von Interesse zu prüfen, ob die KH-Zelllinie für den Nachweis von Antikörpern gegen die genannten Virusarten in Blutseren von Rindern und Schweinen herangezogen werden kann.

Für den Neutralisationstest wurden die Sera 30 min. bei  $56^{\circ}\text{C}$  inaktiviert und in den Verdünnungen 1:5 bis 1:320 nach der im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Technik geprüft. Als Testvirus diente infizierte Zellkulturflüssigkeit. Die Ansätze erfolgten stets vergleichend in Kulturen der KH-Zelllinie und prim. KH-Zellen. Die Ergebnisse sind auszugsweise im folgenden dargestellt.

Bei den Versuchen mit dem bovinen Enterovirus war, wie die in Tabelle 9 aufgeführten Beispiele zeigen, ein von den Rinderseren 1 bis 5 in unterschiedlicher Stärke bewirkter Neutralisationseffekt in den Kulturen beider Zellarten feststellbar.

Tabelle 9: Neutralisationsversuche mit Enterovirus LCR 4 in Kulturen der KH-Zelllinie und prim. KH-Zellen (Röhrchentest)

| Sera                  | Nr. | Virus-dosis                     | Serumtiter in     |                 | Virus-dosis                     | Serumtiter in |                 |
|-----------------------|-----|---------------------------------|-------------------|-----------------|---------------------------------|---------------|-----------------|
|                       |     |                                 | KH-Zell-linie     | prim. KH-Zellk. |                                 | KH-Zell-linie | prim. KH-Zellk. |
| mit neutral. Wirkung  | 1   | 160                             | 160 <sup>x)</sup> | 40              | 800                             | 40            | 20              |
|                       | 2   | KID <sub>50</sub>               | 80                | 40              | KID <sub>50</sub>               | 20            | 10              |
|                       | 3   | xx)                             | 80                | 20              | xx)                             | 20            | 10              |
|                       | 4   |                                 | 40                | 20              |                                 | 20            | 10              |
|                       | 5   |                                 | 40                | 10              |                                 | 10            | 5               |
| ohne neutral. Wirkung | 6   | 160<br>KID <sub>50</sub><br>xx) | < 5               | < 5             | 800<br>KID <sub>50</sub><br>xx) | < 5           | < 5             |

x) reziproker Wert der höchsten Serumverdünnung mit Neutralisationseffekt

xx) bemessen nach dem Titer in prim. KH-Zellkulturen

Die Titer der einzelnen Sera lagen bei gleicher Virusdosis in der KH-Zelllinie allerdings regelmässig höher als in prim. KH-Zellkulturen, was mit der unterschiedlichen Virusempfindlichkeit der beiden Kulturarten erklärt werden kann.

Im Interesse der Reproduzierbarkeit der Resultate erwies es sich im übrigen als vorteilhaft, die Dosis des Testvirus nach dem Vorversuch an prim. KH-Zellkulturen festzulegen. Die Titer des Enterovirus LCR 4 zeigten nach unseren Beobachtungen bei der KH-Zelllinie

stärkere Schwankungen als bei prim. KH-Zellkulturen; wurde bei der Ermittlung der Virusdosis für den Neutralisationstest vom Infektiositätstiter der KH-Zelllinie ausgegangen, so konnte die Virusmenge leicht zu hoch bemessen sein und dann trotz der aus Tabelle 9 erkennbaren Tendenz der (scheinbaren) Verstärkung des Neutralisationseffektes in der KH-Zelllinie ein niedriger Antikörpergehalt im Serum dem Nachweis entgehen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen erscheint die KH-Zelllinie für den Neutralisationstest mit dem bovinen Enterovirus LCR 4 nur mit Einschränkung geeignet.

Günstiger waren offensichtlich die Voraussetzungen für den Antikörpernachweis gegen Aujeszky-Virus (Stamm H II) mit Hilfe der KH-Zelllinie in Schweineseren. Die in Tabelle 10 wiedergegebenen Werte lassen erkennen, daß die Serumtiter in den Kulturen der KH-Zelllinie und prim. KH-Zellen gut übereinstimmten. Für die Dosierung des Testvirus konnte die Titration in beiden Kulturarten herangezogen werden.

Tabelle 10: Neutralisationsversuche mit Aujeszky-Virus H II in Kulturen der KH-Zelllinie und prim. KH-Zellen (Röhrchentest)

| Serum | Virusdosis        | Serumtiter in    |                 | Virusdosis        | Serumtiter in |                 |
|-------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|---------------|-----------------|
|       |                   | KH-Zelllinie     | prim. KH-Zellk. |                   | KH-Zelllinie  | prim. KH-Zellk. |
| 1     | 20                | 30 <sup>x)</sup> | 30              | 200               | 40            | 40              |
| 2     | KIT <sub>50</sub> | 40               | 40              | KIT <sub>50</sub> | 20            | 20              |
| 3     |                   | <5               | <5              |                   | <5            | <5              |

x) reziproker Wert der höchsten Serumverdünnung mit Neutralisationseffekt

### 3. Kulturversuche zum Virusnachweis in Organ- und Kotproben

Um eingehendere Aufschlüsse über die Eignung der KH-Zelllinie für den Virusnachweis in Untersuchungsmaterial zu erhalten, wie es im Rahmen der Routinediagnostik anfällt, wurden diesbezügliche Versuche mit 96 Gewebe- und Organproben angestellt, die hauptsächlich von Rindern und in geringer Zahl von Schweinen stammten. Die Anzüchtung von Virus wurde ferner mit 87 Rinder- und 26 Schweinekotproben versucht.

Zum Vergleich wurden stets prim. KH-Zellkulturen herangezogen. Die Feststellung der Anwesenheit von Virus stützte sich wie in den vorangegangenen Experimenten auf die Ermittlung des CPE, so daß nicht-cytopathogene Virusstämme, wie sie z.B. bei MD/VD-Infektionen vorkommen, nicht erfasst wurden. Der Bestätigung des Virusnachweises dienten Subpassagen in Zellkulturen. Versuche zur Identifizierung der Isolate beschränkten sich auf den Chloroformtest und den Neutralisationstest mit Immunseren gegen MD/VD-, IBR/IPV-Entero (LCR 4)- und Aujeszky-Virus.

Weitere Angaben über das Untersuchungsmaterial und die Versuchstechnik finden sich in den Abschnitten III A 4. - 7.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 11 aufgezeichnet. Aus Gewebe- und Organproben vom Rind konnten in prim. KH-Zellkulturen 6 chloroformempfindliche Virusstämme angezüchtet werden, von denen 5 serologisch als MD/VD-Virus identifiziert wurden. Keiner dieser Stämme war in Kulturen der KH-Zelllinie angegangen. Aus Kotproben vom Rind gelang die Isolierung von 5 chloroformstabilen Virusstämmen in

beiden Zellkulturarten; zwei der Isolate waren auf Grund der serologischen Untersuchung dem Enterovirus Typ LCR 4 zuzuordnen.

Cytotoxische Effekte wurden in den Kulturen der KH-Zelllinie seltener beobachtet als in prim. KH-Zellkulturen. In der erstgenannten Zellkulturart war dies bei der Verimpfung von insgesamt 8 Materialien, in der zweiten Kulturart in 23 Fällen zu beobachten.

Tabelle 11: Virusnachweis in Organ- und Kotproben

| Untersuchungs-<br>material                | Virusanzüchtungen      |                           | Virusart                                                  |
|-------------------------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                                           | in<br>KH-<br>Zelllinie | prim.<br>KH-<br>Zellkult. |                                                           |
| Gewebe- und<br>Organproben<br>von Rindern | 0                      | 5                         | MD/VD-Virus                                               |
|                                           | 0                      | 1                         | chloroformempfind-<br>lich, nicht weiter<br>differenziert |
| Kotproben<br>von Rindern                  | 2                      | 2                         | bovines Enterovirus<br>Serotyp wie LCR 4                  |
|                                           | 3                      | 3                         | chloroformstabil,<br>nicht weiter<br>differenziert        |
| Organe<br>von<br>Hühnern                  | 2                      | 0                         | Newcastle Disease-<br>Virus                               |

In Tabelle 11 ist ferner das Ergebnis von Anzüchtungsversuchen in Zellkulturen mit Organmaterial zweier Hühner aufgenommen. In beiden Fällen konnte

mit Hilfe der KH-Zelllinie Newcastle Disease-Virus isoliert werden; in prim. KH-Zellkulturen gelang dies dagegen nicht. Der Virusnachweis war zuvor bereits im bebrüteten Hühnerei erbracht worden.

Die Kulturversuche mit Organ- und Kotproben bestätigten eindeutig die in den vorangegangenen Untersuchungen mit bekanntem Infektionsmaterial erzielten Ergebnisse bezüglich der Empfänglichkeit der KH-Zelllinie und prim. KH-Zellkulturen für MD/VD-, Newcastle Disease- und bovines Enterovirus.

#### IV. Besprechung der Ergebnisse

Bei der Prüfung der verschiedenen Zellkulturen auf ihre Empfänglichkeit für eine Auswahl beim Rind mehr oder weniger häufig vorkommender Virusarten konnten alle verwendeten Virusstämme bekannter Herkunft in prim. KH-Zellkulturröhrchen zur Vermehrung gebracht und anhand des cytopathischen Effektes titriert werden. Bei der Bewertung der Infektiositätstiter ist zu beachten, dass die Inokula jeweils dem im Röhrchen befindlichen Erhaltungsmedium zugefügt wurden, so daß die Konzentration um eine log 10-Stufe herabgesetzt wurde.

In Röhrchenkulturen der KH-Zelllinie, deren Eignung im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden sollte, liessen sich nur das bovine Enterovirus und die beiden Augeszy-Virusstämme züchten und auf Grund des cytopathischen Effektes titrieren, wobei die Infektiositätstiter insbesondere im erstgenannten Falle niedriger lagen als in Primärkulturen. Die Stämme der ID/VD, die Bovinen Adenoviren und Parainfluenza 3-Virus konnten dagegen in der KH-Zelllinie nicht vermehrt werden. Das gleiche galt offensichtlich auch für die Virusstämme der IBR/IPV, obwohl hier in den Kulturen der KH-Zelllinie bei der ersten Passage am Ende der Bebrütungsdauer durch Rückimpfung auf Primärkulturen infektiöses Virus in nicht allzu grosser Menge nachgewiesen wurde. Die Resultate der folgenden zweiten und dritten Passage und eines ergänzenden Versuches sprachen jedoch dafür, dass vom ursprünglichen Inoculum stammende restliche Infektiosität erfasst worden war. Das nachgewiesene Virus war offenbar an den Zelloberflächen adsorbiert oder viel-

leicht auch in die Zellen aufgenommen worden, ohne dass neue komplette Virusteilchen gebildet wurden. Ein abortiver Zyklus wäre denkbar (AURELIAN u. ROIZMAN, 1964; RAPP u. GUENTZEL, 1969).

Die Versuche mit Schälchen-Kulturen ergaben, dass die Infektiosität des bovinen Enterovirus und des Aujeszky-Virus H II anhand der Plaquebildung in prim. KH-Zellen ermittelt werden konnten. In den Kulturen der KH-Zelllinie liessen sich Plaques unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht erzeugen. Mit Rücksicht auf die Ergebnisse des Röhrchentests dürfte die Ursache des beobachteten Unterschiedes beim Schälchentest im Wachstumsmodus der Polylayer oder in hemmenden Einflüssen des Überschichtungsmediums zu suchen sein.

Ein etwas überraschendes Resultat brachten die anhangsweise durchgeführten Experimente mit dem Newcastle Disease Virus, dessen Züchtung im Röhrchentest zwar mit der KH-Zelllinie, nicht aber mit prim. KH-Zellkulturen gelang. Die festgestellten Infektiositätstiter erreichten allerdings nicht die im Brutei üblichen Werte.

Mit den vorstehend geschilderten Ergebnissen der KH-Zelllinie stimmte das Verhalten der in einem Teil der Versuche mitgeführten FtH-Zelllinie grundsätzlich überein.

Die Neutralisationsversuche mit dem verwendeten bovinen Enterovirusstamm zeigten, dass sich die KH-Zelllinie für den Nachweis von spezifischen Antikörpern in Rinderseren nur bedingt eignete. Mit dem Aujeszky-Virus H II lieferte die diesbezügliche

Untersuchung von Schweineseren hingegen brauchbare Resultate.

Aus den Organ- und Kotproben von Rindern konnten in Kulturen der KH-Zelllinie zwei Enterovirusstämme vom Serotyp LCR 4 und drei chloroformstabile, sonst nicht weiter differenzierte Virusstämme isoliert werden. Dem Nachweis entgingen in dem genannten Zellsystem fünf MD/VD-Virusstämme und ein chloroformempfindliches nicht näher bestimmtes Virus, die in den vergleichsweise mitgeführten prim. KH-Zellkulturen zusätzlich angezüchtet werden konnten. In Organmaterial zweier Kühner waren Newcastle Disease-Feldvirusstämme dagegen nur mit Hilfe der KH-Zelllinie nachweisbar. Die Ergebnisse bestätigen die mit bekannten Virusstämmen festgestellten Empfänglichkeitsunterschiede der angeführten Zellkulturarten.

Zusammenfassend betrachtet hat sich in den vorliegenden Untersuchungen die KH-Zelllinie für die Diagnostik von Virusinfektionen insbesondere des Rindes als in sehr beschränktem Umfang verwendbar erwiesen. Die Eignung der Fth-Zelllinie ist nicht günstiger zu beurteilen. Beide Systeme sind nach ihrem Wachstum und der erreichten Lebensdauer etablierte Zelllinien, die hinsichtlich der Empfänglichkeit für mehrere bovine Virusarten den prim. KH-Zellen deutlich nachstehen. Bemerkenswert erscheint, dass das Vorhandensein oder Fehlen dieser Eigenschaft bei der KH-Zelllinie nicht mit der Gruppenzugehörigkeit nach der Virus-Systematik übereinstimmt, wie das Verhalten von IBR/IPV- und Aujeszky-Virus oder von Parainfluenza 3- und Newcastle Disease-Virus zeigt.

Die Frage der Virusempfänglichkeit und Resistenz

permanenter Zellkulturen ist vielfach bearbeitet und diskutiert worden. BANG u. GEY (1952) fanden, dass eine maligne Zelllinie für Eastern Equine Encephalomyelitis-Virus viel empfänglicher war als eine Mäusefibroblasten-Linie, von der sie abstammte. SHEFFIELD u. CHURCHER (1957) und DUNHAM u. EWING (1957) berichteten über eine Umkehr von Resistenz zu Empfänglichkeit für Poliomyelitis-Virus bei Zelllinien, die von unempfindlichen Tierspecies abgeleitet worden waren. LUDWIG u. PAULSEN (1969) fanden die aus der Kälbercornea-Zelllinie KC isolierte, mehr epitheloide Linie KCe weniger empfänglich für verschiedene tierpathogene Viren als die KC-Linie.

LEBEDEV u. Mitarb. (1972) berichteten über die zunehmende Ausbildung einer Resistenz gegen MKS-Virus in Kulturen, die auf ~~Wem~~ Virus nicht geschädigte Zellen einer primären Meerschweinchen-Nierenzellkultur zurückgingen. Gleichsinnige Beobachtungen hatten u.a. schon VOGT u. DULBECCO (1958) an Zellen mit verminderter Empfänglichkeit für bestimmte Enteroviren gemacht. WESTLOOD u. Mitarb. (1957) hatten eine derartige Umkehr auf eine Transformation der Zellen zurückgeführt.

Die verschiedene Empfänglichkeit einiger Zelllinien für Poliomyelitis-Virus haben McLAREN u. Mitarb. (1959) mit dem unterschiedlichen Vermögen der Zellen erklärt, Virus zu adsorbieren. Auch nach der Ansicht von HOLLAND u. Mitarb. (1959) spielen Faktoren eine Rolle, welche die frühen Virus-Zell-Beziehungen regulieren. In anderen Fällen ist eine fehlende oder verminderte Empfänglichkeit auf das Unvermögen der Zellen zurückgeführt worden, fortgeschrittene Phasen

des Vermehrungszyklus zu unterhalten oder es wurden physiologische Vorgänge wie pH-Wert-Verschiebung verantwortlich gemacht (MELNICK u. Mitarb., 1957; SCHWÖBEL u. SIEDENTOPF, 1961). Ferner ist denkbar, dass im Laufe der Zeit eine Selektion stattfindet und aus der Population Zellen hervorgehen, die entweder empfänglicher oder resistenter als die Ursprungszellen sind. Im Falle der Resistenz ist dies vielleicht auf den Verlust von Rezeptoren für bestimmte Virusarten zurückführen (DIDERHOLM u. DINTER, 1965, 1970).

## V. Zusammenfassung

1. Bei der Prüfung einer Kälberhoden-Zelllinie konnten unter Verwendung bekannter Virusstämme in Röhrchenkulturen ein bovines Enterovirus und zwei Aujeszky-Virusstämme zur Vermehrung gebracht und anhand des cytopathischen Effektes titriert werden; mit Stämmen der infektiösen bovinen Rhinotracheitis/infektiösen pustulösen Vulvovaginitis und der Mucosal Disease/Virusdiarrhoe, mit Adenoviren oder Parainfluenza 3-Virus gelang dies nicht. In den zum Vergleich herangezogenen primären Kälberhoden-Zellkulturen liessen sich alle verwendeten Virusstämme züchten.

Für ein Newcastle Disease-Virus zeigte sich die Kälberhoden-Zelllinie, nicht aber die Primärkultur empfänglich.

Mit den Ergebnissen der Kälberhoden-Zelllinie stimmte das Verhalten einer bovinen Fetushaut-Zelllinie grundsätzlich überein.

Anhand der Plaquebildung konnten bovines Enterovirus und Aujeszky-Virus unter den gewählten Versuchsbedingungen in primären Kälberhoden-Zellkulturen, nicht jedoch in Kulturen der Kälberhoden-Zelllinie nachgewiesen und titriert werden.

2. Für den Antikörpernachweis im Röhrchenneutralisationstest mit dem verwendeten bovinen Enterovirus erwies sich die Kälberhoden-Zelllinie nur bedingt geeignet, während mit Aujeszky-Virus brauchbare Resultate erzielt wurden.

3. Aus Organ- und Kotproben von Rindern wurden in Kulturen der Kälberhoden-Zelllinie zwei Enterovirusstämme vom Serotyp LCR 4 und drei chloroformstabile, sonst nicht weiter differenzierte Virusstämme isoliert; nicht erfasst wurden dagegen fünf Stämme der Mucosal Disease/Virus-Diarrhoe sowie ein chloroformempfindliches nicht näher bestimmtes Virus, die in den vergleichsweise mitgeführten Primärkulturen zusätzlich angezüchtet werden konnten.

In Organmaterial zweier Hühner waren Newcastle Disease-Feldvirusstämme nur mit Hilfe der Kälberhoden-Zelllinie nachweisbar.

4. Soweit die vorliegenden Untersuchungen Aufschluss geben, ist die Kälberhoden-Zelllinie im Rahmen der Diagnostik von Virusinfektionen insbesondere des Rindes nur sehr beschränkt verwendbar.

## VI . Literatur-Verzeichnis

1. Aldasy, P. (1970): Die durch Adenoviren bedingte Pneumonie des Kalbes.  
Fortpfl.Haust. 6, 302-305
2. Aurelias, L. und B. Roizman (1964): The host range of Herpes Simplex Virus. Interferon, viral DNA, and antigen synthesis in abortive infection of dog kidney cells.  
Virology 22, 452-461
3. Avellini, G. (1968): Bovine virus diarrhea in Italy.  
Arch.ges.Virusforsch. 24, 48-75
4. Babiker, A. und R. Rott (1968): Biologische Eigenschaften des Virus N.  
Zbl. Vet.Med. B 15, 353-356
5. Bang, F.B. and G.O.Gey (1952): In Bull.Johns Hopkins Hosp. 91, 427 zit. nach Pereira (1961)  
The cytopathic effect of animal viruses.  
Advan.Virus Res. 8, 245-285
6. Bartha, A. (1968): Viruserkrankungen des Respirationstraktes der Rinder.  
Mh. Vet.Med. 16, 613-617
7. Bergmann, H. und H. Liebermann (1967): Isolierung und Charakterisierung boviner Parainfluenza-3-Viren in der DDR.  
Arch. exper. Vet.Med. 21, 1486-1497
8. Bindrich, H. (1961): Das im Darmtraktus des Menschen und Tiere vorkommende und in der Gewebekultur zytopathogene Orphan-Virus.  
Berliner und Münchener Tierärztl.Wschr. 14, 276-278
9. Bögel, K. und M. Mussgay (1960): Isolierung und Charakterisierung eines Enterovirus des Rindes.  
Zbl. Vet.Med. 7, 535-552
10. Bögel, K. und A. Mayr (1961): Untersuchungen über die Chloroformresistenz des Enterovirus des Rindes und des Schweines.  
Zbl. Vet.Med. 8, 908-922

11. Bögel, K. (1964): Über die Eignung des Plättchen-tests für die Diagnostik der Mucosal Disease.  
Zbl.Bakt.Abt.I Orig. 193, 34-39
12. Bonin, O. und H. Hövel (1973): Diploide Zellen: Substrat für Virus-Impfstoff-Produktion.  
Die gelben Hefte (Behring) 12.Jg., 61
13. Bürki, F. (1962): Studien über bovine Enteroviren.  
Zbl.Vet.Med. 9, 748-759
14. Bürki, F. (1963): Studien über bovine Enteroviren.  
Monatsh.f.Tierheilkunde 15, 91-96
15. Bürki, F. (1970): Aetiologisch klassifizierbare Virusinfektionen bei Haustieren. Stand 1970.  
Dtsch. tierärztl.Wschr. 77, 307-316
16. Capstick, P.B. and A.J.Garland (1965): Observations on the use of BHK 21 Clone 13 cells for Foot and Mouth Disease vaccine production.  
Bull.Off.int.Epiz. 64, 215-223
17. Cooper, P.D. (1961): The plaque assay of animal viruses  
Advan.Virus Res. 8, 319-378
18. Diderholm, H. and Z. Dinter (1965): A line of Polyoma transformed BHK-cells insusceptible to foot and mouth disease virus.  
Virology 26, 369-372
19. Diderholm, H. and Z. Dinter (1970): Susceptibility to some animal viruses of cells transformed by SV 40 or Polyoma virus.  
Arch.exper.Vet.Med. 24, 29-32
20. Dwight, S.B. (1964): zit. nach Flow Laboratories Catalogue 1973
21. Dulbecco, R. (1952): Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 747-752
22. Dulbecco, R. and M. Vogt (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with polio-myelitis viruses.  
J. Exper.Med. 99, 167-182
23. Dunham, W.D. and F.M. Ewing (1957):  
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N.Y. 97, 637  
zit. nach Pereira (1961)

24. Gey, G., F. Bang and M. Gey (1954): Responses of a variety of normal and malignant cells to continuous cultivation and some practical applications of these responses to problems in the biology of disease. Ann.N.Y. Acad. Sci. 58, 976-999
25. Gillespie, J.H., J.A.Baker and K.McEntee (1959): A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. Cornell Vet. 51, 73-79
26. Grafe, A. (1967): Die Verwendung von primären Kälberhoden-Zellkulturen für virologische Arbeiten. Arch. ges. Virusforsch. 22, 433-441
27. Guenov, J., I. Schopov, S. Shljabinkov, K. Sartmadshiev, W.Fjodorov und S.Simeonov (1969): Untersuchungen zur Differenzierung von aus klinisch gesunden Kälbern isolierten Adenoviren. Zbl. Vet. Med. 16, 335-340
28. Hafez, S.M. (1967): Charakterisierung und Darstellung des Virus der Virusdiarrhoe-Mucosal Disease des Rindes. Diss.Vet.Med. Hannover
29. Hahnenfeld, H. (1970): Infektiöse bovine Rhinotracheitis (IBR). Nachweis von IBR-Virus bei einem Kalb mit Stomatitis erosiva. Mh. Vet. Med. 6, 222-229
30. Hahnenfeld, H. und E.Hahnenfeld (1963): Züchtung und Abwandlung von Maul- und Klauenseuchevirus Typ C in einer permanenten Zelllinie aus embryonalem Ferkelhirn. Arch.exper.Vet.Med. 17, 893-896
31. Hallauer, C., G. Kronauer und G.Siegl (1971): Parvoviruses as contaminants of permanent cell lines 1. virus isolations. Arch. ges. Virusforsch. 35, 80-90
32. Hayflick, L. (1965): Tissue cultures and mycoplasmas. Tex. Rep. Biol. Med. 23, 285-303
33. Holland, J.J., L.C.Malaren and J.T.Syvertson (1959): Proc.Soc. Exper. Biol. Med. N.Y. 100, 843  
zit. nach Pereira (1961)

34. Horzinek, M., J. Maess and R. Laufs (1971):  
Studies on the Substructure of Togaviruses  
II. Analysis of Equine Ateritis, Rubella,  
Bovine Viral Diarrhea and Hog cholera  
Viruses.  
Arch. ges. Virusforsch. 33, 306-318
35. Kalk, K. and F. Hetrick (1965): Establishment and  
characterisation of bovine lymphnode cell  
cultures.  
Amer. J. Vet. Res. 26, 865-872
36. Kaminjolo, J.S. (1969): Serologische Untersuchungen  
über die Verbreitung von Antikörper gegen  
die Viren der Mucosal Disease, der Infekti-  
ösen Rhinotracheitis bzw. Pustulären  
Vulvovaginitis und der Parainfluenza-3  
bei Rindern in Hessen.  
Diss. Vet. Med. Giessen
37. Kniazeff, A.J., W.A.Nelson-Rees and N.B.Darby jr. (1964)  
zit. nach Flow Laboratories Catalogue 1973
38. Kniazeff, A.K., D. Constantine, W. Nelson-Rees and  
D. Schmidt (1965): zit. nach Flow Laboratories  
Catalogue 1973
39. Kokles, R., D. Urbaneck, H. Liebermann and  
A.F.Olechnowitz (1967): Vergleichende fluoreszenz-  
immunologische und zytopathologische  
Untersuchungen mit verschiedenen Virus-  
stämmen der Mucosal Disease des Rindes.  
Arch. exper. Vet. Med. 5, 1296-1304
40. Lebedev, A.I., M.M.Goglev, L.I.Mutuzkin und  
Z.P.Mutuzkina (1972): Spezifische, durch MKS-Virus  
bedingte Zellresistenz.  
Veterinarija Moskva 48, 1, 31-33  
nach dem Referat Landw.Zentralbl. 4, 1973
41. Lehmann-Grube, F. (1961): Comparative susceptibility  
of mammalian cells in culture to proto-  
type enterovirus.  
Arch. ges. Virusforsch. 11, 276-283
42. Liebermann, H., H. Hahnenfeld und E.Hahnenfeld (1966):  
Einige chemisch-physikalisch und  
biologische Eigenschaften des Virus der  
Stomatitis vesicularis (Typ Indiana).  
Arch.exper.Vet.Med. 20, 839-847

43. Liebermann, H. (1966): Serologische Studien zum Vorkommen der Mucosal Disease/Virus Diarrhoe der Rinder im Ostseebezirk der DDR.  
Mh.Vet.Med. 4, 146-149
44. Liess, B. und W. Höpken (1962): Versuche zur Differenzierung von Enterovirusstämmen des Rindes. 1. Serologische und plaque-morphologische Charakterisierung in Kälberhodenzellen.  
Zbl.Bakt.Abt. I Orig. 186, 437-457
45. Lorenz, R.J. (1962): Zur Statistik des Plaquetests.  
Arch. ges. Virusforsch. 12, 108-137
46. Ludwig, H. und J. Paulsen (1969): Isolierung und fluoreszenzserologische Untersuchung von Parainfluenza-3 Viren aus Vaginal- und Nasentupern vom Rind.  
Zbl. Vet.Med. B 16, 231-239
47. Ludwig, H., J. Paulsen und J.S.Kaminjolo (1969): Kälbercornea-Zellen in Kultur.  
Zschr.med.Mikrobiol.u.Immunol. 155, 133-149
48. Madin, S.H. and N.B.Darby (1958): Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin.  
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. N.Y. 98, 574-576
49. Mayr, A. und Mitarbeiter (1973): Fortbildungskursus für Institutstierärzte in der Labordiagnose tierischer Virusinfektionen am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere München, Oktober 1973
50. McClain and Hackett (1958): zit. nach Liebermann, H. (1967) Im Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren Bd. II S. 681 VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1967)
51. McLaren, L.C., J.J.Holland and J.T.Syvertson (1959):  
J.Exper.Med. 109, 475 zit. nach Pereira (1961)
52. Mebus, C.A., M.Kono, N.R.Underdahl and M.Twiehaus (1971):  
Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (Scours) Virus.  
Can.Vet.Jour. 12, 69-72

53. Medina, D. and L.Sachs (1963): Studies on the lytic interaction and cell transformation with a large- and small-plaque mutant of Polyoma virus.  
Virology 19, 127-139
54. Melnick, J.L., G.D.Hsiung, C.Rappaport, D.Howes and M.Ressig (1957): Texas Rep.Biol. Med. 15, 496,  
zit. nach Pereira (1961)
55. Ogata, M. and K.Koshimizu (1967): Isolation of mycoplasmas from tissue cell lines and from transplanted tumor cells.  
Jap.J.Microbiol. 17, 289-301
56. Pereira, H.G. (1961): The cytopathic effects of animal viruses.  
Advan.Virus Res. 8, 245-285
57. Pereira, H.G., R.J.Huebner, H.S.Ginsberg and J.van der Veen (1963):  
A short description of the Adenovirus group.  
Virology 20, 613-620
58. Pirtle, E.C. and A.J.Kniazeff (1968):  
Susceptibility of cultured mammalian cells to infection with virulent and modified hog cholera viruses.  
Amer. J. Vet. Res. 29, 1033-1040
59. Rapp, F. and M.S.Guentzel (1969): Polyribosomes of cells abortively or productively infected with Adenovirus, Papovavirus or their hybrid.  
Arch. ges. Virusforsch. 28, 255-268
60. Reed, L.J. and H.Muench (1938): A simple method of estimating fifty percent end points.  
Amer.J.Hyg. 27, 493-497
61. Rott, R. (1965): Untersuchungen über die Feinstruktur des infektiösen Partikels der Newcastle Disease und über die neben ihm auftretenden, nichtinfektiösen virusspezifischen Einheiten. Ein Beitrag zur Klassifizierung der Myxoviren.  
Zbl.Vet.Med. B 12, 97-116
62. Russeff, Chr. (1970): Charakterisierung von Picornaviren, die aus Zellkulturen von Ferkelhirn isoliert wurden.  
Zbl. Vet. Med. B 17, 300-306

63. Schimmelpfennig, H. und B. Liess (1961):  
Entwicklung und Histochemie der Kernein-  
schlußkörperchen in Gewebekulturen aus  
Rinderhodenzellen bei Rhinotracheitis  
infectiosa des Rindes.  
Zbl. Vet. Med. 8, 461-472
64. Schwöbel, W. und V. Siedentopf (1961):  
Charakterisierung eines drei Jahre alten  
Zellstammes aus der Schweineniere und  
Untersuchungen über sein Verhalten gegen-  
über dem Virus der Maul- und Klauenseuche.  
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 181, 3-16
65. Sethi, K.K. (1972): On the incidence of mycoplasma  
contamination in cell cultures.  
Zbl. Bakt. Hyg. 1 Abt. 219, 550-554
66. Sheffield, F.W. and G.M.Churcher (1957):  
Brit.J.Exper.Path. 38, 943  
zit. nach Pereira (1961)
67. Škoda, R., C.-H.Becker und O.Jamrichová (1968):  
Zur Morphologie der Gewebekulturen  
nach Infektion mit dem Herpes-suis-Virus  
(Aujeszkysche Krankheit).  
Arch. exper.Vet.Med. 22, 1051-1082
68. Syverton, J.T. and William F.Scherer (1954):  
The application of mammalian cells  
in continuous culture for assays  
in virology.  
Ann.N.Y.Acad. Sci. 58, 1056-1071
69. Ulbrich, F. (1971): Aujeszkysvirus als 'pick-up'  
in Kälberhodenzellkulturen.  
Arch.exper.Vet.Med. 25, 937-941
70. Vogt, M. and R. Dulbecco (1958):  
Virology 8, 60, zit. nach Pereira (1961)
71. Western Hemisphere Committee on animal virus  
characterization (1970).  
Animal reference virus recommendations.  
Am.J.Vet.Res. 31, 1915-1928
72. Westwood, J.C., I.A.Macpherson and D.H.J.Titmus (1957):  
Brit. J. Exper. Path. 38, 138  
zit. nach Pereira (1961)
73. Wilke, I. und W. Letz (1970): Gleichzeitiges  
Auftreten von Konjunktivitis und  
Vulvovaginitis verursacht durch  
IbR/IPV Virus in einer Färsenherde.  
Fortpfl.Haust. 6, 256-263

74. Yershov, F.I. and V.M. Zhdanov (1965):  
Influence of PPLO on production of  
Interferon in virus-infected cells.  
Virology 27, 451-453
75. Youngner, J.S. (1954): Monolayer cultures.  
1. Preparation and standardisation of  
suspensions of trypsin-dispersed monkey  
kidney cells.  
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N.Y. 85,  
202-205

Nachtrag:

76. Mauersberger, B. (1971): Aktuelle Probleme der  
Zellzüchtung.  
Gustav Fischer Verlag Stuttgart
77. Starke, G. (1968): Virologische Praxis.  
2. Auflage  
VEB Fischer Verlag Jena
78. Starke, G. und P. Hlinak (1972):  
Grundriss der Allgemeinen Virologie.  
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

Nach Beendigung dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. E. Nitzschke für die freundliche Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Hilfe sehr herzlich danken.

Herrn Professor Dr.Dr.K.Fritzsche, dem damaligen Direktor des Landes-Veterinäruntersuchungsamtes für Rheinland-Pfalz danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Institut zu beginnen.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Landes-Veterinäruntersuchungsamtes in Koblenz für ihre Hilfe während der Anfertigung der Arbeit.



## L e b e n s l a u f

Am 16. April 1942 wurde ich als Sohn der Eheleute Abraham und Bernice Eze geb. Agu in Ngwo, Nigeria geboren.

Von Januar 1948 bis Dezember 1956 besuchte ich die Volksschule St. Mary's Anglican Central School Ngwo.

1957 - 1963 besuchte ich das Gymnasium Dennis Memorial Grammar School Enitsha, wo ich 1961 das West African School Certificate ablegte. 1963 erwarb ich das Higher School Certificate und 1964 das General Certificate of Education, Advanced Level.

Von September 1964 bis Mai 1965 studierte ich Pharmakologie an der University of Ibadan, Nigeria.

Nach dem Besuch der Sprachschule am Walchensee/Obb.

von Juni bis Oktober 1965 begann ich im November 1965 mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität zu Gießen, wo ich im Januar 1971 die Tierärztliche Prüfung bestand.

Von Februar 1971 bis Mai 1973 war ich am Landes-Veterinäruntersuchungsamt in Koblenz tätig, um meine Dissertation anzufertigen.

Seit Juni 1973 bin ich bei der Firma Hennemann, Kälbermast GmbH & Co KG Vilshofen-Mühlham, angestellt.





FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/ Ecke Ludwigstraße  
Telefon 0641 - 77449